



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :  <b>A61K 7/48</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/41674</b>  (43) Date de publication internationale: 20 juillet 2000 (20.07.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00034</p> <p>(22) Date de dépôt international: 10 janvier 2000 (10.01.00)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 99/00406 15 janvier 1999 (15.01.99) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): L'OREAL [FR/FR]; 14, rue Royale, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BRETON, Lionel [FR/FR]; 10, rue Satory, F-78000 Versailles (FR). BERNERD, Françoise [FR/FR]; 37, rue Marcadet, F-75018 Paris (FR). MARTIN, Richard [FR/FR]; 8, allée du Clos du Pin, F-37210 Rochebon (FR).</p> <p>(74) Mandataire: GALUP, Cédric; L'Oréal/D.P.I., 6, rue Bertrand Sincholle, F-92585 Clichy Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: USE OF A PLANT EXTRACT OF THE GENUS ROSMARINUS IN COMPOSITIONS FOR TREATING AGEING SKIN SYMPTOMS</p> <p>(54) Titre: UTILISATION D'UN EXTRAIT D'UN VEGETAL DU GENRE ROSMARINUS DANS DES COMPOSITIONS DESTINEES A TRAITER LES SIGNES CUTANES DU VIEILLISSEMENT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the use of at least a plant extract of at least the genus Rosmarinus, in or for the preparation of a composition for preventive and/or curative treatment of the ageing skin symptoms. In particular the extract or the composition are designed to stimulate the restoring of the skin structure and/or to inhibit degeneration of the skin and/or the mucous membranes by stimulating collagen synthesis and/or by inhibiting collagenase.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus, dans ou pour la préparation d'une composition destinée à traiter, de manière préventive et/ou curative, les signes cutanés du vieillissement. En particulier, l'extrait ou la composition sont destinés à stimuler la restructuration et/ou inhibiter la dégradation de la peau et/ou des muqueuses par la stimulation de la synthèse du collagène et/ou par l'inhibition des collagénases.</p>			

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Utilisation d'un extrait d'un végétal du genre Rosmarinus dans des compositions destinées à traiter les signes cutanés du vieillissement**

L'invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition destinée à traiter, de manière préventive et/ou curative, les signes cutanés du vieillissement. En particulier, l'extrait ou la composition sont destinés à stimuler la restructuration et/ou inhiber la dégradation de la peau et/ou des muqueuses par la stimulation de la synthèse du collagène et/ou par l'inhibition des collagénases. L'invention a également pour objet un procédé de traitement cosmétique de la peau et/ou des muqueuses.

La peau humaine est constituée de deux compartiments à savoir un compartiment superficiel, l'épiderme, et un compartiment profond, le derme.

15 L'épiderme humain naturel est composé principalement de trois types de cellules qui sont les kératinocytes, très majoritaires, les mélanocytes et les cellules de Langerhans. Chacun de ces types cellulaires contribue par ses fonctions propres au rôle essentiel joué dans l'organisme par la peau.

20 Le derme fournit à l'épiderme un support solide. C'est également son élément nourricier. Il est principalement constitué de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire composée elle-même principalement de collagène, d'élastine et d'une substance, dite substance fondamentale, composants synthétisés par le fibroblaste. On y trouve aussi des leucocytes, des mastocytes ou encore des macrophages tissulaires. Il est également traversée par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Dans une peau normale, c'est à dire non pathologique ni cicatricielle, le fibroblaste est à l'état quiescent, c'est à dire non prolifératif, peu actif d'un point de vue métabolique et non mobile.

25 30 Ce sont les fibres de collagène qui assurent la solidité du derme. Les fibres de collagène sont constituées de fibrilles scellées les unes aux autres, formant ainsi plus de dix types de structures différentes. La solidité du derme est en grande partie due à l'enchevêtrement des fibres de collagène tassées les unes contre les autres en tous sens. Les fibres de collagène participent à l'élasticité et à la tonicité de la peau et/ou des muqueuses.

35 Les fibres de collagènes sont constamment renouvelées mais ce renouvellement diminue avec l'âge ce qui entraîne un amincissement du derme. Cet

amincissemement du derme est également dû à des causes pathologiques comme par exemple l'hypersécrétion d'hormones corticoïdes, certaines maladies (syndrome de Marfan, syndrome de Ehlers-Danlos) ou encore des carences vitaminiques (scorbut). Il est également admis que des facteurs extrinsèques 5 comme les rayons ultraviolets, le tabac ou certains traitements (Glucocorticoïdes, vitamine D et dérivés par exemple) ont également un effet sur la peau et sur son taux de collagène.

Cependant, divers facteurs entraînent la dégradation du collagène, avec toutes les 10 conséquences que l'on peut envisager sur la structure et/ou la fermeté de la peau et/ou des muqueuses.

Bien que très résistantes, les fibres de collagène sont sensibles à certaines enzymes appelées collagénases. Une dégradation des fibres de collagène 15 entraîne l'apparence de peau molle et ridée que l'être humain, préférant l'apparence d'une peau lisse et tendue, cherche depuis toujours à combattre.

Les collagénases font partie d'une famille d'enzymes appelées métalloprotéinases (MMPs) qui sont elles-mêmes les membres d'une famille d'enzymes 20 protéolytiques (endoprotéases) qui possèdent un atome de zinc coordonné à 3 résidus cystéine et une méthionine dans leur site actif et qui dégradent les composants macromoléculaires de la matrice extracellulaire et des lames basales à pH neutre (collagène, élastine, etc. ...). Très largement répandues dans le monde vivant, ces enzymes sont présentes, mais faiblement exprimées, dans des 25 situations physiologiques normales comme la croissance des organes et le renouvellement des tissus.

Leur surexpression chez l'homme et leur activation sont cependant liées à de nombreux processus, parfois pathologiques, qui impliquent la destruction et le remodelage de la matrice. Cela entraîne soit une résorption non contrôlée de la 30 matrice extracellulaire, soit inversement l'installation d'un état de fibrose.

La famille des métalloprotéinases est constituée de plusieurs groupes bien définis basés sur leurs ressemblances en terme de structure et de spécificité de substrat (voir Woessner J. F., Faseb Journal, vol. 5, 1991, 2145). Parmi ces groupes, on peut citer les collagénases destinées à dégrader les collagènes fibrillaires (MMP-1 35 ou collagénase interstitielle, MMP-8 ou collagénase de neutrophile, MMP-13 ou collagénase 3), les gélatinases qui dégradent le collagène de type IV ou toute forme de collagène dénaturé (MMP-2 ou gélatinase A (72 kDa), MMP-9 ou gélatinase B (92 kDa)), les stromélysines (MMP-3) dont le large spectre d'activité

s'adresse aux protéines de la matrice extracellulaire telles que les glycoprotéines (fibronectine, laminine), les protéoglycannes, etc., ou encore les métalloprotéinases membranaires.

L'exposition prolongée aux rayonnements ultraviolets, particulièrement aux rayonnements ultraviolets de type A et/ou B, a pour effet une stimulation de l'expression des collagénases, particulièrement de la MMP-1. C'est là une des composantes du vieillissement cutané photo-induit.

5

Par ailleurs à la ménopause, les principales modifications concernant le derme sont une diminution du taux de collagène et de l'épaisseur dermique. Cela entraîne chez la femme ménopausée un amincissement de la peau et/ou des muqueuses. La femme ressent alors une sensation de "peau sèche" ou de peau qui tire et l'on constate une accentuation des fines rides et ridules de surface. La peau présente un aspect rugueux à la palpation. Enfin la peau présente une souplesse diminuée.

On comprend alors à la lecture de ce qui précède l'importance du collagène dans la structure des tissus, particulièrement de la peau et/ou des muqueuses, et l'importance qu'il y a à non seulement maintenir son taux dans les tissus mais également à combattre sa dégradation pour ainsi lutter contre le vieillissement qu'il soit chronobiologique ou photo-induit et ses conséquences, l'amincissement du derme et/ou la dégradation des fibres de collagène ce qui entraînent l'apparence de peau molle et ridée.

Un des buts de la présente invention est donc de pouvoir disposer d'un produit nouveau qui présente une effet stimulateur de la synthèse du collagène, un effet inhibiteur des collagénases et si possible pas d'effets secondaires notables.

25

Or, de manière surprenante et inattendue la demanderesse a maintenant découvert qu'un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus présente une activité stimulatrice de la synthèse du collagène et une activité inhibitrice de l'activité des collagénases.

30

Les végétaux du genre Rosmarinus, outre leurs propriétés gustatives et odorantes, sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires. On peut citer à cet égard les demandes de brevet FR-A-2504551, JP-A-7017846, WO-A-9325209, SU-A-1733000, FR-A-2662078, DE-A-3536342, US 5393526 ou encore la demande déposée par la demanderesse sous le numéro WO-A-9701288.

A la connaissance de la demanderesse l'activité stimulatrice de la synthèse du collagène et l'activité inhibitrice de l'activité des collagénases d'un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus n'ont jamais été décrites.

- 5 Ainsi, l'invention a pour objet premier l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à traiter, de manière préventive et/ou curative, les signes cutanés du vieillissement.
- 10 Par extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus, on entend aussi bien un mélange brut de parties du végétal grossièrement réduites en morceaux et du solvant d'extraction que des préparations élaborées des principes actifs solubilisés lors de l'extraction.
- 15 Par principe actif, on entend toute molécule ou composition susceptible de modifier ou de moduler le fonctionnement d'au moins un système biologique donné.

Par signes cutanés du vieillissement on entend toutes modifications de l'aspect extérieur de la peau dues au vieillissement qu'il soit chronobiologique et/ou photo-induit, comme par exemple les rides et ridules, la peau flétrie, la peau mole, la peau amincie, le manque d'élasticité et/ou de tonus de la peau, mais également toutes modifications internes de la peau qui ne se traduisent pas systématiquement par un aspect extérieur modifié, comme par exemple toutes 25 dégradations internes de la peau, particulièrement du collagène, consécutives à une exposition aux rayonnements ultra-violets.

L'invention a pour second objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, 30 l'extrait ou la composition étant destinés à stimuler de la synthèse du collagène.

L'invention a pour troisième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à inhiber l'expression des protéases de la 35 matrice extracellulaire, particulièrement des métalloprotéinases et encore plus particulièrement de la métalloprotéinase de type 1.

L'invention a pour quatrième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à traiter les atteintes cutanées liées à la ménopause.

5

L'invention a pour cinquième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre les rides et ridules.

10 L'invention a pour sixième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre la peau flétrie.

15 L'invention a pour septième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre la peau molle.

20 L'invention a pour huitième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre la peau amincie.

25 L'invention a pour neuvième objet l'utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre le manque d'élasticité et/ou de tonus de la peau.

30 L'extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus utilisé selon l'invention peut être obtenu à partir de matériel végétal issu de plante entière ou de partie de plante comme les feuilles, les tiges, les fleurs, les pétales, les racines ou encore des cellules dédifférenciées.

Par cellules végétales dédifférenciées, on entend toute cellule végétale ne présentant aucun des caractères d'une spécialisation particulière et capable de vivre par elle-même et non en dépendance avec d'autres cellules.

35

Préférentiellement selon l'invention on utilise de la plante entière, particulièrement de la tige et/ou des feuilles, très particulièrement des feuilles.

L'extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus peut être tout extrait préparé à partir de tout matériel végétal issu d'au moins un végétal du genre Rosmarinus cultivé *in vivo* ou issu de culture *in vitro*.

5 Par culture *in vivo* on entend toute culture de type classique c'est à dire en sol à l'air libre ou en serre, ou encore hors sol.

Par culture *in vitro*, on entend l'ensemble des techniques connues de l'homme du métier qui permet de manière artificielle l'obtention d'un végétal ou d'une partie 10 d'un végétal. La pression de sélection imposée par les conditions physico-chimiques lors de la croissance des cellules végétales *in vitro* permet d'obtenir un matériel végétal standardisé et disponible tout au long de l'année contrairement aux plantes cultivées *in vivo*.

15 Préférentiellement selon l'invention on utilise un végétal du genre Rosmarinus issu de culture *in vivo*.

L'espèce *Rosmarinus officinalis* comporte deux variétés qui sont *Rosmarinus tenuifolius* et *Rosmarinus latifolius*.

20 L'extrait de l'invention peut être préparé à partir de matériel végétal provenant de l'espèce *Rosmarinus officinalis* quelque soit la variété.

Toute méthode d'extraction connue de l'homme du métier peut être utilisée pour préparer l'extrait selon l'invention.

25 On peut, en particulier, citer les extraits alcooliques, notamment éthanoliques ou encore hydroalcooliques.

Préférentiellement selon l'invention, l'extrait est un extrait aqueux.

30 On peut également utiliser un extrait préparé par la méthode décrite dans la demande de brevet français n° 95-02379 déposée par la demanderesse.

Ainsi, dans une première étape on broie le matériel végétal dans une solution aqueuse à froid et dans une deuxième étape les particules en suspension sont éliminées de la solution aqueuse issue de la première étape. Cette solution 35 aqueuse correspond à l'extrait.

Eventuellement, dans une troisième étape on stérilise la solution aqueuse issue de la deuxième étape.

Cet extract peut alors être lyophilisé.

La première étape peut être avantageusement remplacée par une opération de congélation simple des tissus végétaux (par exemple à -20°C ou encore à -180°C dans l'azote liquide), suivie d'une extraction aqueuse reprenant les deuxième et troisième étapes ci-dessus décrites.

5

Le traitement à froid permet de geler les activités enzymatiques, la filtration stérilisante évite la dégradation des actifs par les micro-organismes de l'environnement. Enfin, le véhicule eau est compatible avec les récepteurs *ex vivo* et facilite les formulations cosmétiques ou pharmaceutiques.

10

Il est connu que les extraits végétaux contiennent des oxydases responsables, entre autres, de l'oxydation desdits extraits. Or une telle oxydation conduit à une coloration marron foncée des extraits et à une odeur âcre rendant ceux-ci peu compatibles avec leur utilisation en cosmétique. Dans cet ordre d'idée on connaît en particulier une laccase dont le poids moléculaire est supérieur à 100000 daltons.

Ainsi, avantageusement, l'extrait obtenu peut être fractionné par toute méthode de fractionnement connue permettant d'éliminer les oxydases et en particulier la polyphénoloxydase. On peut par exemple filtrer l'extrait de l'invention sur une membrane de dialyse afin d'en éliminer les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 100000 daltons. Il est également possible de faire subir à l'extrait un fractionnement par précipitations sélectives.

25 D'autres méthodes permettent de se prémunir des phénomènes d'oxydation. En particulier, l'extrait peut également être stabilisé. Toute méthode de stabilisation connue peut être utilisée selon l'invention. On peut par exemple stabiliser l'extrait de l'invention par barbotage d'azote pour éliminer l'oxygène dissout ou encore en y ajoutant de la cystéine et/ ou des dérivés soufrés à une concentration finale comprise entre 0,5 g/l et 10 g/l et de préférence entre 1 g/l et 2,5 g/l.

Bien évidemment l'extrait selon l'invention peut être fractionné et stabilisé.

L'extrait peut constituer à lui seul le principe actif des compositions de l'invention.

35

Sous une forme particulière de l'invention, l'extrait ne contient pas d'acide rosmarinique.

Un exemple de préparation d'extrait utilisable selon l'invention est donné par ailleurs dans les exemples.

La quantité d'extrait utilisable selon l'invention est bien entendu fonction de l'effet recherché et peut donc varier dans une large mesure.

Pour donner un ordre de grandeur, on peut utiliser un extrait tel que défini précédemment en une quantité représentant de 0,001% à 20% du poids total de la composition et préférentiellement en une quantité représentant de 0,01% à 10% du poids total de la composition.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de traitement cosmétique de la peau destiné à stimuler la synthèse du collagène et/ou traiter les atteintes cutanées liées à l'âge et/ou à la ménopause et/ou lutter contre l'amincissement du derme et/ou combattre l'apparence de la peau molle et/ou ridée, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau, sur les cheveux, et/ou sur les muqueuses, une composition cosmétique comprenant au moins extrait d'au moins un végétal du genre *Rosmarinus*.

Le procédé de traitement cosmétique de l'invention peut être mis en œuvre notamment en appliquant les compositions cosmétiques telles que définies ci-dessus, selon la technique d'utilisation habituelle de ces compositions. Par exemple : application de crèmes, de gels, de sérum, de lotions, de laits, de shampoings ou de compositions anti-solaires, sur la peau, ou sur les cheveux ou encore application de dentifrice sur les gencives.

Les exemples et compositions suivants illustrent l'invention sans la limiter aucunement. Dans les compositions les proportions indiquées sont des pourcentages en poids.

30

Exemple 1 : Préparation d'un extrait de *Rosmarinus officinalis* :

636 grammes de matériel végétal de *Rosmarinus officinalis*, partie aérienne correspondant à des tiges et des feuilles, sont plongés dans environ 1 kg d'azote liquide.

35 Après élimination des tiges, les feuilles sont réduites en poudre par broyage au Turrax à 24000 T/min. durant 1 minute à 4°C (bain de glace).

La poudre obtenue est mélangée à 5 litres de tampon phosphate 0,05 M à pH 8,5. L'ensemble est agité durant 30 minutes à 4°C, puis centrifugé à 10000 G à 4°C.

Le surnageant est filtré à 0,22 µm (filtration stérilisante).

L'extrait est alors fractionné par ultrafiltration sur membrane de type Sartorius afin d'en éliminer les phénomènes d'oxydation.

L'extrait est ensuite lyophilisé. On obtient ainsi 29,5 grammes d'extrait actif 5 dénommé "extrait lyophilisé".

Exemple 2 : Effet de l'extrait de l'exemple 1 sur la synthèse du collagène :

L'étude est faite par mesure de l'incorporation de proline radioactive dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux.

10 Les cultures de fibroblastes sont effectuées selon les méthodes classiques de culture cellulaire, à savoir en milieu MEM/M199 vendu par la société Gibco, en présence de bicarbonate de sodium (1,87 mg/ml) de L-glutamine (2 mM), de pénicilline (50 UI/ml) et de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco).

15 Le test est effectué sur des cultures de cellules à 80% de confluence en plaque de 24 trous. L'extrait de l'exemple 1 (extrait lyophilisé titré à 25 mg/ml d'eau pour obtenir une solution mère à 100%), aux concentrations finales de 0,2%, 1% et 2%, est mis en contact avec les cellules pendant 48 heures. Le marquage à la proline tritiée (L-[2,3-<sup>3</sup>H]-proline vendue par Amersham, 33 µCi/ml) est effectué pendant 20 24 heures.

Le taux de proline tritiée incorporée est mesuré en fin de test par précipitation acide des protéines sur filtres et comptage en scintillation liquide.

25 Les résultats sont évalués par rapport à un témoin constitué par des cellules n'ayant pas été traitées avec l'extrait de l'exemple 1.

Un témoin positif (vitamine C à 20 µg/ml) connu pour stimuler la synthèse du collagène est introduit dans le test comme référence.

30 Les résultats de ce test, exprimés en pourcentages d'activation, sont présentés dans le tableau suivant :

Traitement	cpm	%	p
Cellules non traitées	7498	-	-
Vitamine C	13091	75	<0,01
Extrait de l'exemple 1	0,2%	9537	8 >0,05
	1%	9181	22 >0,05
	2%	8098	27 >0,05

cpm : coups par minute

p : intervalle de confiance calculé selon la méthode de Dunnett.

Ces résultats montrent que l'extrait de l'exemple 1 stimule de façon significative  
 5 l'incorporation de proline dans le collagène et donc qu'il présente un effet sur la néosynthèse du collagène.

Exemple 3 : Effet de l'extrait de l'exemple 1 sur l'expression des collagénases.

10 L'étude permet d'évaluer l'efficacité d'un produit à inhiber l'induction de la transcription du gène de la collagénase par le rayonnement ultra-violet.

Le test est réalisé sur des cellules Hela (ATCC CCL2) dans lesquelles le promoteur du gène de la collagénase 1 (3,8 kB) cloné en amont du gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) a été introduit.  
 15

Les cellules sont exposées à un rayonnement ultra-violet B (UVB) émis par un tube Philips TL 12W/20, filtrés KADACEL afin d'éliminer les UVC, aux doses de 5 et 10 mj/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont alors mises en contact pendant 2 heures avec l'extrait de l'exemple 1 à des concentrations variant de 0,05% à 0,5%.

20 Le dosage de la CAT est réalisé à l'aide d'un kit "CAT-Elisa" vendu par la société Boehringer, selon les indications du fournisseur.

Un "taux de base" de l'expression de la CAT est mesuré dans des cellules n'ayant reçu ni rayonnement ultra-violet ni traitement par le produit à tester.

Les résultats du test, présentés dans le tableau ci-joint, sont exprimés par rapport  
 25 au taux de base (100%), en pourcentage d'activation ou d'inhibition de l'expression du gène CAT.

Ces résultats reflètent donc l'activité du promoteur de la collagénase 1 après induction par les ultra-violets et en présence ou non du produit à tester.

UV B*	Sans extrait	Extrait à 0,05%	Extrait à 0,1%
5	926	416	289
10	3930	1104	568

30 \* : Dose en mj/cm<sup>2</sup>

Ces résultats montrent que :

- l'activité du promoteur de la collagénase est stimulée par les rayons UVB (colonne "sans extrait") ;

- cette stimulation est diminuée en présence de l'extrait de l'exemple 1 (colonnes "Extrait à ...") ;

5 Ces résultats montrent bien l'effet inhibiteur de la synthèse de la collagénase 1, par inhibition de l'activité de son promoteur, de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* de l'exemple 1.

10 Exemple 4 : Exemples de formulations illustrant l'invention et particulièrement les compositions selon l'invention associant au moins un extrait de *Rosmarinus officinalis*. Ces compositions ont été obtenues par simple mélange des différents composants.

**Composition 1 : Lotion démaquillante pour le visage**

Extrait de l'exemple 1	10,00	%
15 Antioxydant	0,05	%
Isopropanol	40,00	%
Conservateur	0,30	%
Eau	qsp	100,00 %

20 **Composition 2 : Shampooing**

Extrait de l'exemple 1	0,50	%
Hydroxypropylcellulose (Klucel H® vendu par la société Hercules)	1,00	%
Parfum	0,50	%
Conservateur	0,30	%
25 Eau	qsp	100,00 %

**Composition 3 : Crème de soin du visage (émulsion huile dans eau)**

Extrait de l'exemple 1	2,00	%
Stéarate de glycérol	2,00	%
30 Polysorbate 60 (Tween 60® vendu par la société ICI)	1,00	%
Acide stéarique	1,40	%
Triéthanolamine	0,70	%
Carbomer	0,40	%
Fraction liquide du beurre de karité	12,00	%
35 Perhydrosqualène	12,00	%
Antioxydant	0,05	%
Parfum	0,50	%
Conservateur	0,30	%

	Eau	qsp	100,00	%
<b>Composition 4 : Gel pour la peau</b>				
5	Extrait de l'exemple 1		0,50	%
	Acide tout trans rétinoïque		0,05	%
	Hydroxypropylcellulose (Klucel H® vendu par la société Hercules)		1,00	%
	Antioxydant		0,05	%
	Isopropanol		40,00	%
10	Conservateur		0,30	%
	Eau	qsp	100,00	%
<b>Composition 5 : Gel pour le soin du visage</b>				
15	Extrait de l'exemple 1		5,00	%
	Hydroxypropylcellulose (Klucel H® vendu par la société Hercules)		1,00	%
	Antioxydant		0,05	%
	Isopropanol		40,00	%
	Conservateur		0,30	%
	Eau	qsp	100,00	%
20	<b>Composition 6 : Gel</b>			
	Extrait de l'exemple 1		1,00	%
	Hydroxypropylcellulose (Klucel H® vendu par la société Hercules)		1,00	%
	Antioxydant		0,05	%
25	Chlorhydrate de lidocaïne		2,00	%
	Isopropanol		40,00	%
	Conservateur		0,30	%
	Eau	qsp	100,00	%
30	<b>Composition 7 : Crème de soin de l'érythème solaire (émulsion huile-dans-eau)</b>			
	Extrait de l'exemple 1		2,50	%
	Stéarate de glycérol		2,00	%
	Polysorbate 60 (Tween 60® vendu par la société ICI)		1,00	%
	Acide stéarique		1,40	%
35	Acide glycyrrhétinique		2,00	%
	Triéthanolamine		0,70	%
	Carbomer		0,40	%
	Fraction liquide du beurre de karité		12,00	%

	Huile de tournesol	10,00	%
	Antioxydant	0,05	%
	Parfum	0,50	%
	Conservateur	0,30	%
5	Eau	qsp	100,00 %

Composition 8 : Crème de soin antirides pour le visage (émulsion huile/eau)

	Extrait de l'exemple 1	5,00	%
	Stéarate de glycérol	2,00	%
10	Polysorbate 60 (Tween 60® vendu par la société ICI)	1,00	%
	Acide stéarique	1,40	%
	Acide n-octanoyl-5-salicylique	0,50	%
	Triéthanolamine	0,70	%
	Carbomer	0,40	%
15	Fraction liquide du beurre de karité	12,00	%
	Perhydrosqualène	12,00	%
	Antioxydant	0,05	%
	Parfum	0,50	%
	Conservateur	0,30	%
20	Eau	qsp	100,00 %

Composition 9 : Lotion

	Extrait de l'exemple 1	0,50	%
	Acide glycolique	50,00	%
25	Hydroxypropylcellulose (Klucel H® vendu par la société Hercules)	0,05	%
	Conservateur	0,30	%
	NaOH	qsp	pH = 2,8
	Ethanol	qsp	100,00 %

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à traiter, de manière préventive et/ou curative, les signes cutanés du vieillissement.  
5
2. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à stimuler la synthèse du collagène.  
10
3. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à inhiber l'expression des protéases de la matrice extracellulaire.  
15
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée par le fait que l'extrait ou la composition sont destinés à inhiber l'expression des métalloprotéinases.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisée par le fait que l'extrait ou la composition sont destinés à inhiber l'expression de la métalloprotéinase de type 1.  
20
6. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à traiter les atteintes cutanées liées à la ménopause.  
25
7. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre les rides et ridules.  
30
8. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre la peau flétrie.
- 35 9. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre la peau molle.

10. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre *Rosmarinus* dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre la peau amincie.
- 5 11. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre *Rosmarinus* dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre le manque d'élasticité et/ou de tonus de la peau.
- 10 12. Utilisation d'au moins un extrait d'au moins un végétal du genre *Rosmarinus* dans ou pour la préparation d'une composition, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre les dégradations internes de la peau consécutives à une exposition aux rayonnements ultra-violets.
- 15 13. Utilisation selon la revendication 12, l'extrait ou la composition étant destinés à lutter contre les dégradations du collagène.
- 20 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que le matériel végétal est issu de plante entière ou de partie de plante comme les feuilles, les tiges, les fleurs, les pétales, les racines ou encore des cellules dédifférenciées.
15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée par le fait que le matériel végétal est issu des feuilles.
- 25 16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que le matériel végétal est issu d'au moins un végétal du genre *Rosmarinus* cultivé *in vivo* ou issu de culture *in vitro*.
- 30 17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée par le fait que le matériel végétal est issu d'au moins un végétal du genre *Rosmarinus* cultivé *in vivo*.
18. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que l'extrait est un extrait aqueux.
- 35 19. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que l'extrait ne contient pas d'acide rosmarinique.

20. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que l'extrait est utilisé en une quantité représentant de 0,001% à 20% du poids total de la composition.

5    21. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que l'extrait est utilisé en une quantité représentant de 0,01% à 10% du poids total de la composition.

10    22. Procédé de traitement cosmétique de la peau destiné à stimuler la synthèse du collagène et/ou traiter les atteintes cutanées liées à l'âge et/ou à la ménopause et/ou lutter contre l'amincissement du derme et/ou combattre l'apparence de la peau molle et ridée, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau, sur les cheveux, et/ou sur les muqueuses, une composition cosmétique comprenant au moins extrait d'au moins un végétal du genre Rosmarinus.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/FR 00/00034

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 652 001 A (ANDARY CLAUDE) 22 March 1991 (1991-03-22) page 1, line 1 - line 5 page 2, line 34 - line 37 claims	1,12,14
X	DE 41 29 331 A (VISUVIA CHEMISCH PHARMAZEUISCHE) 11 March 1993 (1993-03-11) column 1, line 37 - line 42 column 1, line 58 - line 61 column 2, line 22 - line 33 example 3 claims 1-33	1,12,14, 19-22
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

19 April 2000

Date of mailing of the International search report

27/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Pelli Wablat, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/00034

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CALABRESE V. ET AL.: J.APPL.COSMETOL., vol. 16, no. 4, 1998, pages 155-164, XP002118851 page 156, right-hand column, last paragraph page 161, right-hand column page 162	1,7-14, 20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 199, no. 902, 26 February 1999 (1999-02-26) & JP 10 291929 A (NAGASE &AMP), 4 November 1998 (1998-11-04) abstract	1,2,7, 13-18,20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 438 (C-544), 17 November 1988 (1988-11-17) & JP 63 162611 A (POLA CHEM IND INC), 6 July 1988 (1988-07-06) abstract	1,14-18, 20
X	EP 0 666 072 A (UNILEVER PLC) 9 August 1995 (1995-08-09) abstract & US 5 393 526 A cited in the application	1,7-11
X	FR 2 663 848 A (RAQUET JEAN PAUL) 3 January 1992 (1992-01-03) examples 3,7,10,15,17	1,7-11
P,X	WO 99 30682 A (COLOR ACCESS INC) 24 June 1999 (1999-06-24) page 8, line 28 - line 34 claims 1,5,13-21	1,7-22
X,P	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 14, 22 December 1999 (1999-12-22) & JP 11 246337 A (SHISEIDO CO LTD), 14 September 1999 (1999-09-14) abstract	1,7-22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: AI Application No

PCT/FR 00/00034

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2652001	A	22-03-1991	NONE		
DE 4129331	A	11-03-1993	NONE		
JP 10291929	A	04-11-1998	NONE		
JP 63162611	A	06-07-1988	JP	6092292 B	16-11-1994
EP 0666072	A	09-08-1995	US	5393526 A	28-02-1995
			AU	679596 B	03-07-1997
			AU	1152695 A	17-08-1995
			CA	2141163 A	08-08-1995
			JP	7267821 A	17-10-1995
			NZ	270398 A	21-12-1995
			ZA	9500922 A	06-08-1996
FR 2663848	A	03-01-1992	BE	1004405 A	17-11-1992
WO 9930682	A	24-06-1999	AU	1830199 A	05-07-1999
			EP	0967969 A	05-01-2000
JP 11246337	A	14-09-1999	NONE		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. Internationale No

PCT/FR 00/00034

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 652 001 A (ANDARY CLAUDE) 22 mars 1991 (1991-03-22) page 1, ligne 1 - ligne 5 page 2, ligne 34 - ligne 37 revendications —	1,12,14
X	DE 41 29 331 A (VISUVIA CHEMISCHE PHARMAZUTISCHE) 11 mars 1993 (1993-03-11) colonne 1, ligne 37 - ligne 42 colonne 1, ligne 58 - ligne 61 colonne 2, ligne 22 - ligne 33 exemple 3 revendications 1-33 —	1,12,14, 19-22

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant lever un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Pelli Wablat, B

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No
PCT/FR 00/00034

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CALABRESE V. ET AL.: J.APPL.COSMETOL., vol. 16, no. 4, 1998, pages 155-164, XP002118851 page 156, colonne de droite, dernier alinéa page 161, colonne de droite page 162 ---	1,7-14, 20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 199, no. 902, 26 février 1999 (1999-02-26) & JP 10 291929 A (NAGASE &AMP), 4 novembre 1998 (1998-11-04) abrégé	1,2,7, 13-18,20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 438 (C-544), 17 novembre 1988 (1988-11-17) & JP 63 162611 A (POLA CHEM IND INC), 6 juillet 1988 (1988-07-06) abrégé	1,14-18, 20
X	EP 0 666 072 A (UNILEVER PLC) 9 août 1995 (1995-08-09) abrégé & US 5 393 526 A cité dans la demande	1,7-11
X	FR 2 663 848 A (RAQUET JEAN PAUL) 3 janvier 1992 (1992-01-03) exemples 3,7,10,15,17 ---	1,7-11
P,X	WO 99 30682 A (COLOR ACCESS INC) 24 juin 1999 (1999-06-24) page 8, ligne 28 - ligne 34 revendications 1,5,13-21 ---	1,7-22
X,P	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 14, 22 décembre 1999 (1999-12-22) & JP 11 246337 A (SHISEIDO CO LTD), 14 septembre 1999 (1999-09-14) abrégé	1,7-22

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dom. Internationale No

PCT/FR 00/00034

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2652001	A	22-03-1991	AUCUN		
DE 4129331	A	11-03-1993	AUCUN		
JP 10291929	A	04-11-1998	AUCUN		
JP 63162611	A	06-07-1988	JP 6092292 B		16-11-1994
EP 0666072	A	09-08-1995	US 5393526 A AU 679596 B AU 1152695 A CA 2141163 A JP 7267821 A NZ 270398 A ZA 9500922 A		28-02-1995 03-07-1997 17-08-1995 08-08-1995 17-10-1995 21-12-1995 06-08-1996
FR 2663848	A	03-01-1992	BE 1004405 A		17-11-1992
WO 9930682	A	24-06-1999	AU 1830199 A EP 0967969 A		05-07-1999 05-01-2000
JP 11246337	A	14-09-1999	AUCUN		